

Nötropenik Olmayan Yoğun Bakım Hastalarında İnvazif Pulmoner Aspergilloz İçin Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi ve Bronkoalveoler Lavaj Örneklerinde Galaktomannan ve PCR Testlerinin Tanısal Değerinin Belirlenmesi

Evaluation of Risk Factors for Invasive Pulmonary Aspergillosis and Detection of Diagnostic Values of Galactomannan and PCR Methods in Bronchoalveolar Lavage Samples From Non-Neutropenic Intensive Care Unit Patients

Selçuk ÖZGER¹, Kenan HİZEL², Ayşe KALKANCI³, Müge AYDOĞDU⁴, Füsün CİVİL⁵, Murat DİZBAY², Gül GÜRSEL⁴

¹ Gaziantep Dr. Ersin Arslan Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü, Gaziantep.

¹ Dr. Ersin Arslan State Hospital, Infectious Diseases Department, Gaziantep, Turkey.

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Gazi University Faculty of Medicine, Department of Infectious Disease and Clinical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

⁴ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

⁴ Gazi University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Ankara, Turkey.

⁵ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim dalı, Ankara.

⁵ Gazi University Faculty of Medicine, Department of Public Health, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 10.05.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 01.07.2015

ÖZ

Nötropenik olmayan yoğun bakım (YB) hastaları, invazif pulmoner aspergilloz (İPA) gelişimi için artmış risk taşımaktadır. Bu olgularda, tanı için kullanılabilecek radyolojik ve mikrobiyolojik yöntemlerin (direkt mikroskopi, kültür) duyarlılık ve özgüllükleri oldukça düşüktür. Bu çalışmada, nötropenik olmayan YB hastalarında İPA risk faktörlerinin değerlendirilmesi, galaktomannan (GM) antijen ve *Aspergillus* nükleik asit tespiti yöntemlerinin, İPA için tanısal değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak-Aralık 2013 tarihleri arasında, göğüs hastalıkları YB ünitesinde invazif mekanik ventilasyon (İMV) ile takip edilen ve bronkoskopi uygulanan 44 hasta (13 kadın, 31 erkek; yaş aralığı: 36-96 yıl) dahil edilmiştir.

İletişim (Correspondence): Dr. Selçuk Özger, Dr. Ersin Arslan Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Şahinbey, Gaziantep, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 505 805 6042, **E-posta (E-mail):** sozger@yahoo.com

Hastalardan bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı ve eş zamanlı serum örnekleri alınmıştır. BAL örneklerinde *Aspergillus* DNA'sı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile; BAL ve serum örneklerde GM antijeni ise EIA (Platelia *Aspergillus*, BioRad, Fransa) yöntemi ile çalışılmıştır. İPA için olgu tanımlarının oluşturulmasında EORTC/MSG kriterleri kullanılmış; hastalar yüksek olası İPA, olası İPA ve İPA olmayan olarak gruplandırılmıştır. İPA tanısının konulmasında BAL GM ve BAL *Aspergillus* PCR yöntemlerinin tanı değerinin belirlenmesi için ROC (receiver operating characteristic) analizi uygulanmıştır. Hastaların beşi yüksek olası İPA, altısı olası İPA olarak tanımlanmış ve nötropenik olmayan YB hastalarında İPA insidansı %11.4 olarak (5/44) belirlenmiştir. Yüksek olası İPA olarak tanımlanan grupta, BAL GM düzeyleri, İPA olmayan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır ($p < 0.05$). Yoğun bakım yatış süresinin uzaması, septik şok varlığı ve kümülatif steroid dozunun yüksek olması (> 460 mg), İPA gelişimi için risk faktörleri olarak tespit edilmiştir ($p < 0.05$). BAL GM için 0.7 sınır değerinin İPA tanısındaki duyarlılığı %100 (%95 güven aralığı: 47.9-100), özgüllüğü %87.9 (%95 güven aralığı: 71.7-96.5) olarak bulunmuş ve İPA tanısı için optimal BAL GM değeri ≥ 0.7 olarak değerlendirilmiştir. Serumda GM tespiti ve *Aspergillus* PCR yöntemlerinin İPA tanısı için özgüllükleri yüksek bulunmakla birlikte (sırasıyla, %97.1 ve %93.9), duyarlılıklarının oldukça düşük olduğu (sırasıyla, %33.3 ve %40) izlenmiştir. Sonuç olarak, nötropenik olmayan hastalar, yoğun bakımda yatış süresinin uzadığı ve yüksek doz kümülatif steroid kullanıldığı durumlarda İPA gelişimi açısından değerlendirilmelidir. Bu hastaların BAL sıvısında GM antijenin saptanması, diğer tanısal yöntemlerle karşılaştırıldığında İPA tanısında etkin olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: *Aspergillus*; invazif pulmoner aspergilloz; risk faktörleri; galaktomannan; bronkoalveoler lavaj.

ABSTRACT

Non-neutropenic intensive care unit (ICU) patients are at particular risk for invasive pulmonary aspergillosis. In these cases, radiological and microbiological methods (direct microscopy, culture), which can be used for diagnosis, have quite low sensitivity and specificity. The aims of this study were to evaluate the risk factors for invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in non-neutropenic ICU patients and to determine the diagnostic values of galactomannan (GM) antigen and *Aspergillus* nucleic acid detection methods. A total of 44 patients (13 female, 31 male; age range: 36-96 years) who had been followed at pulmonary ICU with invasive mechanical ventilation and undergone bronchoscopy between January to December 2013, were included in the study. Consecutive bronchoalveolar lavage (BAL) and serum samples were obtained from all of the patients. BAL samples were tested for the presence of *Aspergillus* DNA by polymerase chain reaction (PCR) and both serum and BAL samples were tested for GM antigen by EIA method (Platelia *Aspergillus*, BioRad, France). EORTC/MSG criteria were used for the case definition of IPA. Patients were classified as high-probable IPA, possible IPA and non-IPA. ROC (receiver operating characteristics) analysis was used to determine the diagnostic values of BAL *Aspergillus* PCR and BAL GM in the diagnosis of IPA. Five patients were defined as high-probable IPA and six were defined as possible IPA; thus the incidence rate of IPA was estimated as 11.4% (5/44) among non-neutropenic intensive care unit patients. In high-probable IPA patients, BAL GM levels were significantly higher than non-IPA patients ($p < 0.05$). The prolonged duration in ICU, presence of septic shock and the use of high cumulative doses (> 460 mg) of steroid were found to be risk factors for IPA development. The cut-off value for GM in BAL samples was determined as 0.7, with a sensitivity rate of 100% (95% confidence interval: 47.9-100) and a specificity rate of 87.9% (95% confidence interval: 71.7-96.5), so optimal GM level in BAL was considered as ≥ 0.7 for the diagnosis of IPA. The specificity rates of serum GM and BAL *Aspergillus* PCR methods were high (97.1% and 93.9%, respectively), however their sensitivity rates were found quite low (33.3% and 40%, respectively), in the diagnosis of IPA. In conclusion, development of IPA should be assessed in non-neutropenic patients when the stay in ICU extends and high dose cumulative steroids are used. GM antigen detection in BAL can be used effectively for diagnosis of IPA in these patients compared to other diagnostic methods.

Keywords: *Aspergillus*; invasive pulmonary aspergillosis; risk factors; galactomannan; bronchoalveolar lavage.

GİRİŞ

İnvazif pulmoner aspergilloz, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda görülen ve yüksek morbidite ve mortalite nedeni olan fırsatçı bir enfeksiyondur¹⁻³. Ancak immün baskılanması olmayan yoğun bakım (YB) hastalarında da invazif pulmoner aspergilloz (İPA) artan sıklıkta bildirilmekte olup insidansı %0.33-19 arasında değişkenlik göstermektedir⁴. Nötropenik olmayan YB hastalarında kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) varlığı, steroid kullanımı, çoklu organ yetmezliği, yoğun bakım ve hastane yatış süresindeki uzama İPA gelişimini kolaylaştırmaktadır⁵⁻⁷. Özgül olmayan klinik ve radyolojik bulgular ve kolonizasyon-enfeksiyon ayrımının güçlüğüyle yapılabildiği pozitif kültür sonuçları erken tanı konulmasını zorlaştırmaktadır⁸⁻¹⁰. İPA için altın standart tanı testi kabul edilen histopatolojik inceleme, YB hastalarının büyük çoğunluğunda yapılamamaktadır¹¹. Bu durum, yeni tanı yöntemlerinin kullanıldığı klinik çalışmalara gereksinimi artırmaktadır.

Mantar hücre duvarında yer alan ve doku invazyonu sırasında salındığı bilinen galaktomannan (GM) antijeninin ELISA yöntemiyle vücut sıvılarında saptanması, İPA'nın erken tanısında kullanılmaktadır¹². Nötropenik hastalarda serum GM antijeninin tekrarlayan ölçümleri İPA tanısında kullanılmakla birlikte, ancak nötropenik olmayan hastalarda serum GM ölçümünün duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür¹²⁻¹⁵. Bu olgularda, bronkoalveoler (BAL) sıvısında GM antijeninin saptanmasının İPA tanısındaki duyarlılığı daha yüksektir ve klinik çalışmalardaki önemi giderek artmaktadır¹¹.

Vücut sıvılarında *Aspergillus* nükleik asidinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanmasının İPA tanısındaki duyarlılığı, standardizasyon sıkıntısı nedeniyle değişkendir ve yöntemin tanı algoritmaları içerisindeki yeri henüz netleşmemiştir^{1,16}. İPA tanısı için geliştirilen klinik algoritmalar çoğunlukla immün sistemi baskılanmış hastaları kapsamaktadır¹. Yoğun bakım hastalarında erken tanıya olanak sağlayan klinik algoritmaların geliştirilebilmesi için farklı tanı yaklaşımların uygulandığı klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın amacı; nötropenik olmayan YB hastalarında İPA risk faktörlerinin saptanması, BAL GM antijeni ve PCR ile *Aspergillus* nükleik asidinin saptanmasının, İPA için tanısal değerinin belirlenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Popülasyonunun Belirlenmesi ve Verilerin Toplanması

Göğüs hastalıkları yoğun bakım ünitesinde Ocak-Aralık 2013 tarihleri arasında takip edilen invazif mekanik ventilasyon (İMV) ihtiyacı gösteren ve BAL örneği alınan 18 yaşından büyük tüm hastalar çalışmaya dahil edildi. İmmün baskılanmış (hematolojik malignite, solid organ nakli, son 3 ay içinde radyoterapi ve kemoterapi, KOAH dışında steroid kullanımı) ve nötropenik (mutlak nötrofil sayısı < 500 mm³) hastalar çalışma dışında bırakıldı.

Klinik Örneklerin Toplanması

Yoğun bakım klinisyenleri tarafından bronkoskopi uygulanan 44 hastadan toplam 77 BAL örneği alındı. Birden fazla BAL yapılan hastaların son alınan BAL örnekleri değerlendirildi.

dirmeye dahil edildi. BAL örnekleme ile eş zamanlı klinik değerlendirme yapıldı. YB yatış süresi ve İMV süresi, yatış APACHE II skorları, klinik pulmoner enfeksiyon skorları (CPIS), Charlton komorbidite indeksleri (CCI), toplam kullanılan steroid dozları, kullanılan antibiyotikler, laboratuvar sonuçları ve radyolojik bulgular kaydedildi. BAL örnekleri ile eş zamanlı olarak serum örnekleri alındı; 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildikten sonra -20°C'de saklandı.

Klinik Örneklerde GM ve *Aspergillus* PCR Testleri

Alınan örnekler direkt mikroskopik inceleme ve fungal kültür yapıldıktan sonra -20°C'de saklandı. Fungal kültür için Sabouraud dekstroz agar kullanıldı ve 2 gün 37°C'de, ardından 25°C'de 7 gün inkübe edildi. İzole edilen küfler plaktaki üreme hızları, renkleri, spor ve hif yapılarının mikroskopik özelliklerine göre morfolojik olarak tanımlandı.

GM Tespiti

Toplanan BAL ve serum örneklerinde GM antijeni üretici firma (Platelia *Aspergillus*, BioRad, Fransa) talimatları doğrultusunda ELISA yöntemi ile 1 ay içerisinde çalışıldı. Oda ısısında çözünen örneklerden 300 µL alınarak mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve 100 µL serum treatment solution (R7) eklendi. Pozitif kontrol, negatif kontrol ve eşik değer (cut-off) süspansiyonlarından 300 µL santrifüj tüpüne konulup 100 µL R7 eklendi. 97°C'de 3 dakika inkübe edildikten sonra 10.000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Kitin içerisinde bulunan striplere 50 µL konjugat (R6) eklendi. Santrifüj edilen örneklerin üst sıvısından 50 µL alınarak konjugat içeren striplere eklendi; 37°C'de 90 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Cam bir steril tüp içinde, her bir strip için 200 µL TMB substrat tamponu (R8), 40 µL kromojen TMB (R9) karıştırıldı ve hazırlanan süspansiyondan 200 µL her bir kuyucuğa dağıtıldı. 30 dakika ışısız ortamda bekletildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µL durdurma solüsyonu (R10) eklendi ve 2 dakika bekletildi. Sonuçlar spektrofometrede 450 nanometre dalga boyunda okundu (Elx800, BioTek, ABD). Sonuçlar, serum için ≥ 0.5 , BAL örnekleri için $\geq 0.5-0.7-0.8-1.0-1.5-2.0$ sınır değerlerine göre pozitif ve negatif olarak değerlendirildi.

BAL Örneklerinden DNA İzolasyonu ve PCR

Her BAL örneğinden 300 µl alınarak üzerine 1000 µl eritrosit parçalama tamponu eklendi. Beş dakika -20°C'de inkübe edildikten sonra 10.000 devirde 3 dakika santrifüj edildi; üstteki kısım atıldı ve üzerine 100 µL parçalama solüsyonu ve 5 µL proteinaz K eklendi. Örnekler 65°C'de 2 saat, daha sonra 95°C'de 10 dakika inkübe edildi. Ardından 10.000 devirde 1 dakika santrifüj edilen örneklerin üst kısmından 100 µL temiz tüplere aktarıldı. Üzerine 400 µL DNA erime//bağlama solüsyonu eklendi ve karışım 65°C'de 10 dakika bekletildikten sonra 4°C'de tutuldu. Ependorf tüplerinin kapakları açılmadan önce spin santrifüj uygulandı, üzerine 500 µL DNA çöktürme solüsyonu eklenip karıştırıldı. 15 dakika 13.000 devirde santrifüj edildikten sonra üst kısım tamamen alınıp vakumlu santrifüj ile kurutuldu. Son olarak, 50 µL DNA örnek çözme tamponu ile sulandırıldı ve elde edilen total DNA miktarları DNA ölçüm cihazında ölçülerek DNA varlığı kontrol edildi.

Elde edilen DNA örnekleri gerçek zamanlı PCR cihazında çoğaltıldı. Çoğaltma basamağı için en az 10 ng/µL DNA kullanıldı. Çoğaltma için LightCycler (Roche Diagnostics,

ABD) cihazı ve LightCycler yazılımının 4.0 versiyonu kullanıldı. BAL örneklerinden elde edilen DNA'ların (reaksiyonda pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı) çoğaltılmasında *Aspergillus*'a özgül primer [ileri primer (F) 5'-CTG TCC GAG CGT CAT TG -3' ve geri primer (R) 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT-3'] ve prob (TaqMan Probu; FAM-AGC CGA CAC CCA ACT TTA TTT-TAMRA) kullanıldı.

Gerçek zamanlı PCR uygulamalarında prob teknolojisi kullanıldı. Amplifikasyon karışımı; kalıp DNA, FastStart DNA Master Plus HybProbe karışım tamponu, mantar primeri ve probları (Eurogentec, Belçika) içerecek şekilde hazırlandı. Karışım malzemeleri -20°C'de saklandı. Karışım 4°C'de soğutulan kurşun blok içinde hazırlandı ve kurşun blok, karışım odasında (temiz oda) örnek sayısı kadar kapiller ile dolduruldu. Karışım malzemesi soğutucudan çıkarıldıktan sonra, tüpler alt üst edilerek karıştırıldı.

Her örnek için hazırlanan ana karışımdan 7.5 µL, DNA'dan ise 2.5 µL kapillerlere eklendi. Amplifikasyon kontrolü için sadece karışımdan 10 µL bir kapiller içerisine konuldu ve negatif kontrol olarak kabul edilen, sadece bu kapillerin kapağı karışım odasında (temiz oda) kapatıldı. Diğerleri ise kurşun bloğun içinde ekstraksiyon odasında bulunan biyogüvenlik kabini içine götürüldü ve orada DNA örneği eklendi. Örnekler hızlı bir şekilde spin santrifüj edilerek LightCycler® 2.0 (Roche, Almanya) cihazına yerleştirildi.

Prob kullanıldığı için amplifikasyon üç aşamada gerçekleştirildi; (1) denatürasyon (95°C'de 10 sn, sıcaklık değişimi 10°C/sn), (2) hibridizasyon (zaman ve sıcaklık primerlere bağlı, sıcaklık değişimi 5-20°C/sn), (3) uzama (72°C'de primerlere göre değişen zamanlarda, sıcaklık değişimi 20°C/sn). Gerçek zamanlı PCR amplifikasyonu sonrasında, "absolute quantification" analizi incelenmiştir.

İPA Olgu Tanımları

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar EORTC/MSG tarafından oluşturulan kriterler baz alınarak gruplandırıldı¹. Ayrıca daha önce yapılan klinik çalışmalar dikkate alınarak, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine yanıt alınamayan, diğer etiyolojik nedenlerle açıklanamayan pnömoni ve kötüleşen PA akciğer grafisi bulguları da klinik/radyolojik kriterler olarak kabul edildi^{4,5,17}. Öncelikle serum GM pozitifliği ve BAL örneklerindeki kültür pozitifliği mikolojik kriterler olarak belirlendi. BAL GM veya *Aspergillus* PCR yöntemleri, olgu tanımlarının oluşturulmasında mikolojik kriter olarak kabul edilmedi. Kan GM pozitifliğinin İPA tanı değerinin belirlenebilmesi için, BAL GM pozitifliği mikolojik kriter olarak ele alındı ve İPA olgu tanımları yeniden yapıldı (Tablo I).

İstatistiksel Analiz

Hastalar yüksek olası İPA, olası İPA ve İPA olmayan olarak gruplandırıldı; ancak istatistiksel karşılaştırmalarda olası İPA grubu dışlandı. Tanımlayıcı verilerden kategorik olanlar frekans dağılımı ve yüzde ile ölçüm olanlar ise ortalama ($\pm$) standart sapma ve ortanca (en büyük, en küçük değerler) olarak sunuldu. Hasta gruplarının kategorik verilerinin karşılaştırılmasında Ki-kare testi uygulandı. Ölçümle belirtilen verilerin karşılaştırılmasında, parametrik hipotez test koşullarının karşılanamaması nedeniyle non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. İPA tanısının konulmasında, BAL GM ve BAL *Aspergillus* PCR yöntemlerinin tanı değerinin belirlenmesi için ROC analizi

Tablo 1. Olgu Tanımlarının Oluşturulması

EORTC/MSG kriterleri		
Yüksek olası İPA (Risk faktörü + klinik/radyolojik kriter + mikolojik kriter)	Risk faktörü	Steroid 0.3 mg/kg/gün > 3 hafta prednizolon veya eşdeğer dozda steroid kullanımı
	Radyolojik bulgular	Toraks tomografisinde; hava hilal bulgusu, nodüler lezyon ± halo belirtisi veya geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine yanıtız pnömoni ± PA grafide diğer etiyolojik nedenlerle açıklanamayan progresyon
	Mikolojik kriter	BAL sıvısında <i>Aspergillus</i> için kültür pozitifliği veya serum örneklerinde GM pozitifliği (≥ 0.5)
Olası İPA (Risk faktörü + klinik/radyolojik kriter)	Risk faktörü	Steroid 0.3 mg/kg/gün > 3 hafta prednizolon veya eşdeğer dozda steroid kullanımı
	Radyolojik bulgular	Toraks tomografisinde; hava hilal bulgusu, nodüler lezyon ± halo belirtisi veya geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine yanıtız pnömoni ± PA grafide diğer etiyolojik nedenlerle açıklanamayan progresyon
İPA olmayan	Risk faktörü veya klinik/radyolojik kriterlerin bulunmaması	

uygulandı. Farklı BAL GM sınır değerleri, kan GM ve BAL *Aspergillus* PCR yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer (PPD, NPD) hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

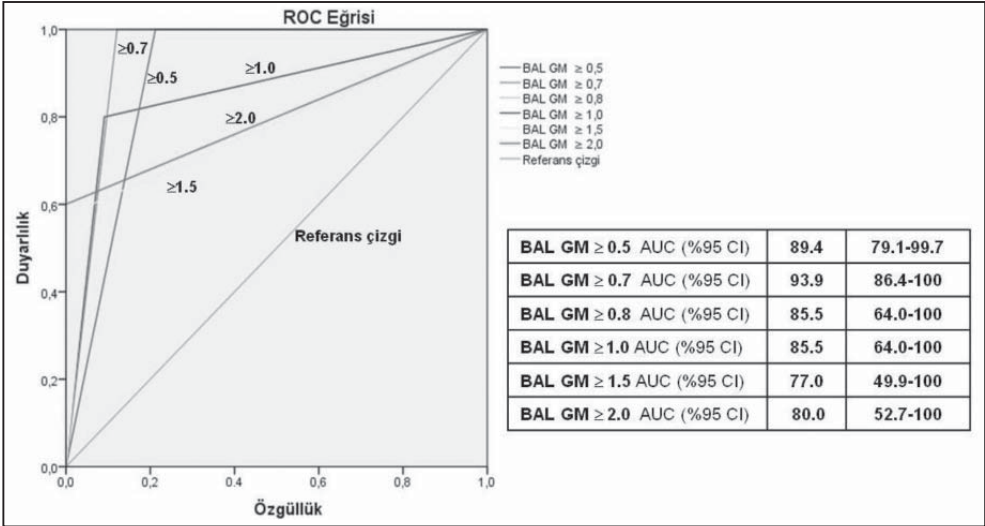
Çalışma kapsamında 13'ü kadın, 31'i erkek 44 kişiye ulaşılmış ve hastalar yüksek olası İPA (n= 5), olası İPA (n= 6) ve İPA olmayan (n= 33) şeklinde gruplandırılmıştır. Yüksek olası İPA ve İPA olmayan gruplar; yaş, altta yatan komorbid durumlar ve çoklu antibiyotik kullanımı açısından karşılaştırılmış, istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Yüksek olası İPA grubunda septik şok varlığı, İPA olmayan grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla, %60 ve %21.2; $p < 0.05$). Kategorik olmayan tanımlayıcı değişkenler açısından, yüksek olası İPA ve İPA olmayan hasta gruplarının karşılaştırması Tablo II'de sunulmuştur.

BAL örneklerinde GM ve *Aspergillus* PCR'ın yüksek olası İPA tanısındaki değerinin saptanması için ROC analizi uygulanmıştır. Yüksek olası İPA olgularında BAL GM pozitifliği için ROC eğrisi altında kalan alan AUC 96.4 [%95 CI (90.4-100)], *Aspergillus* PCR pozitifliği için ROC eğrisi altında kalan alan AUC 67.0 [%95 CI (37.5-96.4)] olarak saptanmıştır. Farklı GM sınır değerlerinin yüksek olası İPA olgularını tahmin gücünü saptamak amacıyla uygulanan ROC analizi sonuçları Şekil 1'de görülmektedir.

Tablo II. Yüksek olasılıklı İPA ve İPA Olmayan Grupların Karşılaştırması

	Yüksek olasılıklı İPA (n= 5)	İPA olmayan (n= 33)	P değeri*
Yaş, yıl (aralık)	82 (73-86)	73.5 (36-96)	< 0.05
APACHE II skoru	19 (18-27)	22.0 (8-38)	0.80
CCI (aralık)	5.0 (3-7)	6.0 (0.10)	0.27
CPIS (aralık)	7.0 (6-9)	6.0 (3-9)	0.23
BAL öncesi YB yatış süresi, gün (aralık)	19 (8-39)	8.0 (1-20)	< 0.05
BAL öncesi İMV süresi, gün (aralık)	12 (8-39)	8.0 (1-20)	< 0.05
BAL öncesi steroid dozu, mg (aralık)	460 (400-1250)	280 (40-1172)	< 0.05
BAL öncesi antibiyotik süresi, gün (aralık)	19 (8-41)	9.5 (1-28)	0.057
BAL öncesi TZP kullanım süresi, gün (aralık)	9 (2-13)	6 (1-17)	0.73
BAL ile TZP son doz arası süre, gün (aralık)	8.5 (5-20)	9.5 (1-30)	0.94
Kan GM (aralık)	0.35 (0.26-0.98)	0.29 (0.21-0.85)	0.11
BAL GM (aralık)	2.76 (0.70-5.06)	0.37 (0.17-1.95)	< 0.05

* P< 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlıdır. BAL: Bronkoalveoler lavaj; CCI: Charlton komorbidite indeksi; CPIS: Klinik pulmoner enfeksiyon skorları; GM: Galaktomannan; İMV: İntravazif mekanik ventilasyon; İPA: İntravazif pulmoner aspergilloz; TZP: Piperasilin-tazobaktam; YB: Yoğun bakım.



Şekil 1. Farklı BAL GM sınır değerlerinin yüksek olasılıklı İPA olgularını tahmin gücü.

Aspergillus PCR, BAL GM ve serum GM tayini yöntemlerinin, yüksek olasılıklı İPA olgularının saptanmasındaki duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri Tablo III'te verilmiştir.

Tablo III. *Aspergillus* PCR, BAL ve Serum GM Testlerinin Yüksek Olası İPA İçin Tanısal Değeri

Test	Sınır değeri	Duyarlılık (%95 CI)	Özgüllük (%95 CI)	Pozitif prediktif değeri (%95 CI)	Negatif prediktif değeri (%95 CI)
BAL GM	≥ 0.5	100 (47.9-100)	78.8 (61.0-90.9)	41.6 (15.3-72.2)	100 (86.6-100)
	≥ 0.7	100 (47.9-100)	87.9 (71.7-96.5)	55.5 (21.4-86.0)	100 (87.9-100)
	≥ 0.8	80.0 (33.1-98.9)	90.9 (83.8-93.8)	57.1 (23.6-70.7)	96.8 (89.2-99.8)
	≥ 1.0	80.0 (28.8-96.7)	90.9 (75.6-97.9)	57.1 (18.7-89.5)	96.7 (83.2-99.4)
Serum GM	≥ 0.5	33.3 (4.9-36.8)	97.1 (92.1-99.8)	66.7 (13.0-98.2)	89.5 (80.0-86.7)
BAL <i>Aspergillus</i> PCR		40.0 (7.8-71.4)	93.9 (89.1-98.7)	50.0 (9.7-89.3)	91.2 (86.4-95.8)

CI: Güven aralığı (confidence interval).

TARTIŞMA

İnvazif fungal enfeksiyonların, yoğun bakım (YB) ünitelerindeki sıklığı ve hasta sağkalımına etkileri artmaktadır. İnvazif *Aspergillus* enfeksiyonları kandida enfeksiyonlarından sonra, YB hastalarında en sık saptanan fungal enfeksiyonlardır^{18,19}. He ve arkadaşları¹⁷ tarafından KOAH ve YB hastalarında yapılan çalışmada; YB öncesi hastanede yatış süresi, çoklu antibiyotik kullanımı, toplam antibiyotik kullanım süresi, steroid kümülatif dozu ve APACHE II skoru İPA gelişimi ile ilgili risk faktörleri olarak saptanmıştır. KOAH, siroz, kronik böbrek yetmezliği, diabetes mellitus, inhaler steroid kullanımı, invazif mekanik ventilasyon ve santral katater varlığı, tanımlanmış olan diğer İPA risk faktörleridir^{4,7}. Çalışmamızda, nötropenik olmayan YB hastalarında İPA insidansı %11.4 (5/44) olarak belirlenmiş; YB’da yatış süresi, İMV süresinin uzaması, kullanılan kümülatif steroid dozu ve septik şok varlığı İPA ile ilişkili risk faktörleri olarak değerlendirilmiştir ($p < 0.05$; Tablo II).

Yoğun bakımda steroid kullanımının, *Aspergillus* türlerinin solunum yollarındaki kolonizasyonu ve İPA gelişimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Steroid kullanım süresindeki uzamanın, solunum yollarında *Aspergillus* izolasyon sıklığını artırdığı gösterilmiştir²⁰. Steroid kullanımının doza bağımlı olarak İPA riskini artırdığı bilinmekte, ancak İPA riskini artıran steroid dozu hakkında görüş birliği bulunmamaktadır. Barberan ve arkadaşları¹⁰, solunum salgılarında tekrarlayan *Aspergillus* üremeleri olan hastalarda 100 mg ve üzeri steroid kullanımının İPA ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. He ve arkadaşları¹⁷ da, kümülatif 350 mg ve üzerinde prednizolon kullanımının İPA riskini 8.6 kat artırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da, literatür²¹ bilgileri ile paralel olarak, steroid kullanımının doza bağımlı olarak İPA gelişiminde etkili olduğu saptanmış ve yüksek olası İPA olgularında kümülatif steroid dozu 460 mg olarak belirlenmiştir.

Klinik ve radyolojik bulguların ayırt edici niteliğinin düşük olması, İPA tanısında mikrobiyolojik yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. Nötropenik hastalarda solunum salgılarından *Aspergillus* izolasyonunun İPA ile ilişkili olma ihtimali yüksektir. Ancak nötropenik olmayan YB hastalarında kolonizasyon enfeksiyon ayrımı güçlüklerle yapılmaktadır¹⁰. Bu nedenle mikrobiyolojik tanı yaklaşımları, konvansiyonel yöntemlerden serolojik ve moleküler yöntemlere doğru kaymaktadır. Vücut sıvılarında GM antijeninin saptanması İPA tanısında kullanılmaktadır. Serum GM antijeninin tekrarlayan pozitifliği, immün siste-

mi baskılanmış hastalarda İPA tanısında oldukça yararlıdır¹². Ancak YB hastalarında serum GM tayininin tanısal duyarlılığının %42'ye kadar düştüğü gösterilmiştir¹⁴. Çalışmamızda, yüksek olası İPA ve İPA olmayan olgular arasında serum GM düzeyleri açısından fark saptanmamıştır. Serum GM düzeyinin, yüksek olası İPA olgularındaki tanısal duyarlılığı %33.3 olarak tespit edilmiştir. Nötropenik olmayan İPA olgularında inflamatuvar yanıtın fazla olması nedeniyle, fungal yükün ve damar invazyonunun daha az olması, bu olgularda serum GM duyarlılığındaki azalmanın en önemli nedenidir. Ayrıca immün sistemi normal hastalarda, GM antijeninin dolaşımdan temizlendiği ve nötrofil sayısının artması ile serum GM antijenin tanı değerinin düştüğü de, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir²².

Bronkoalveoler lavaj sıvısında GM antijen tespitinin İPA tanısındaki duyarlılığı, nötropenik ve nötropenik olmayan hasta gruplarında serum GM antijenine göre daha yüksektir. Bu durum, testin, fungal yükün fazla olduğu primer enfeksiyon bölgesinde çalışılmasından kaynaklanmaktadır^{23,24}. Ancak, serum GM antijeninin aksine, BAL sıvısında GM antijeninin pozitif sınır değeri konusunda görüş birliği bulunmamaktadır. D'Haese ve arkadaşları²⁵ tarafından yapılan çalışmada, nötropenik ve nötropenik olmayan İPA olgularında optimal GM değeri ≥ 0.8 olarak saptanmıştır. Zou ve arkadaşları²⁴ tarafından yapılan meta-analizde ise, İPA için optimal GM değeri ≥ 1.0 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda, BAL GM antijeninin, serum GM antijenine göre İPA tanı değerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. BAL sıvısında farklı GM sınır değerleri için duyarlılık ve özgüllükler belirlendiğinde, nötropenik olmayan YB hastalarında optimal BAL GM değeri ≥ 0.7 olarak tespit edilmiştir (duyarlılık %100, özgüllük %87.9; Tablo III).

Galaktomannan antijeni; beta-laktam antibiyotik kullanımı, *Aspergillus* kolonizasyonu, diğer mantarlar ve gıdalarla çapraz reaksiyon ve laboratuvar kontaminasyonu nedeniyle pozitif olarak saptanabilmektedir^{26,27}. Aubry ve arkadaşları²⁸ tarafından yapılan çalışmada, immünoşüpresif hastalarda beta-laktam kullanımının, serum GM antijenini ortalama üçüncü günde pozitifleştirdiği ve tedavi kesilmesine rağmen pozitifliğin ortalama 5.5 gün devam ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, antibiyotik şişelerinden alınan örneklerin %86'sında GM pozitifliği saptanmıştır²⁸. Çalışmamızda, yüksek olası İPA ve İPA olmayan hasta grupları, piperasilin-tazobaktam (TZP) kullanımı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark izlenmemiş; buna göre TZP kullanımının yüksek olası İPA grubundaki BAL GM pozitifliği ile ilişkisi saptanmamıştır.

Aspergillus PCR yönteminin İPA tanısında kullanımı, hızlı olması ve fungal yükün erken dönemde belirlenmesinde yüksek duyarlılığa sahip olması nedeniyle yaygınlaşmaktadır. Hematolojik maligniteli hastalarda, seri ölçümlerdeki pozitifliğin İPA ile ilişkisi tanımlanmıştır²⁹. Buna karşın, DNA salınımindaki dalgalı seyir nedeniyle kan örneklerinde negatiflikler saptanabilmektedir. Serum örneklerine göre, BAL'da uygulanan PCR'in duyarlılığı daha yüksektir^{29,30}. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda, *Aspergillus* PCR çalışması için serum örnekleri yerine BAL örnekleri tercih edilmiştir. Sun ve arkadaşları¹⁶ tarafından immünoşüpresif hastaları kapsayan bir meta-analizde, BAL sıvısında yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %91 ve %92 olarak belirtilmiştir. Reinwald ve arkadaşlarının³¹ çalışmasında da, immünoşüpresif hastalarda duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %59 ve %87 olarak saptanmıştır. Bir başka meta-analizde de, GM ve PCR yöntemleri karşılaştırılmış; iki tanısal testin birlikte kullanımıyla, özgüllükte belirgin düşme olmadan duyarlılığın artırıl-

labileceği vurgulanmış, ancak PCR yönteminin GM antijen testine tanısal bir üstünlüğü saptanmamıştır³². *Aspergillus* PCR çalışmalarında duyarlılık aralığının değişken olması, yöntemin standardize edilememesinden kaynaklanmaktadır. Ekstraksiyon yöntemi, PCR protokolü, kullanılan primerler ve problemlerdeki farklılıklar nedeniyle sonuçlar değişebilmektedir^{16,31}. *Aspergillus* PCR çalışmalarının çoğu, hematolojik maligniteli immünosüpresif hasta grubunda yapılmış olup, YB hastalarında yöntemin tanısal etkinliğine dair veriler yetersizdir. Çalışmamızda, BAL *Aspergillus* PCR yönteminin, YB hasta grubundaki duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %40 ve %93.9 olarak saptanmış; BAL GM antijen tespiti ile karşılaştırıldığında İPA için tanısal bir üstünlüğü tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, nötropenik olmayan YB hastaları, yatış süresinin uzadığı ve yüksek doz kümülatif steroid kullanımının varlığı durumunda İPA gelişimi açısından değerlendirilmelidir. Bu hastaların BAL sıvısında GM antijenin saptanması, diğer tanısal yöntemlerle karşılaştırıldığında İPA tanısında etkin olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46(12): 1813-21.
2. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. J Infect 2012; 65(5): 453-64.
3. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2008; 46(3): 327-60.
4. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. Clin Infect Dis 2007; 45(2):205-16.
5. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 2007; 30(4): 782-800.
6. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur Respir Rev 2011; 20(121):156-74.
7. Trof RJ, Beishuizen A, Debets-Ossenkopp YJ, Girbes AR, Groeneveld AB. Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients. Intensive Care Med 2007; 33(10): 1694-703.
8. Hachem R, Sumoza D, Hanna H, Girgawy E, Munsell M, Raad I. Clinical and radiologic predictors of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients: should the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG) criteria be revised? Cancer 2006; 106(7): 1581-6.
9. Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, et al. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. Crit Care 2006; 10(1): R31.
10. Barberan J, Alcazar B, Malmierca E, et al; ASP Investigator Group. Repeated *Aspergillus* isolation in respiratory samples from non-immunocompromised patients not selected based on clinical diagnoses: colonisation or infection? BMC Infect Dis 2012; 12: 295.
11. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170(6): 621-5.
12. Maertens JA, Klontz R, Masson C, et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. Clin Infect Dis 2007; 44(10): 1329-36.

13. Maertens J, Verhaegen J, Demuyne H, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3223-8.
14. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177(1): 27-34.
15. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(4): 245-51.
16. Sun W, Wang K, Gao W, et al. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *PloS One* 2011; 6(12): e28467.
17. He H, Ding L, Li F, Zhan Q. Clinical features of invasive bronchial-pulmonary aspergillosis in critically ill patients with chronic obstructive respiratory diseases: a prospective study. *Crit Care* 2011; 15(1): R5.
18. Patterson TF. *Aspergillus* species, pp: 2958-73. In: Mandell GL Bennet J, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
19. Kriengkaukiat J, Ito JI, Dadwal SS. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin Epidemiol* 2011; 3: 175-91.
20. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. A validated clinical approach for the management of aspergillosis in critically ill patients: ready, steady, go! *Crit Care* 2006; 10(2): 132.
21. Hartemink KJ, Paul MA, Spijkstra JJ, Girbes AR, Polderman KH. Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis? *Intensive Care Med* 2003; 29(11): 2068-71.
22. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(1): 81-6.
23. Guo YL, Chen YQ, Wang K, Qin SM, Wu C, Kong JL. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest* 2010; 138(4): 817-24.
24. Zou M, Tang L, Zhao S, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. *PloS One* 2012; 7(8): e43347.
25. D'Haese J, Theunissen K, Vermeulen E, et al. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. *J Clin Microbiol* 2012; 50(4): 1258-63.
26. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 1997; 40(9-10): 353-7.
27. Boonsarngsuk V, Niyompattama A, Teosirmongkol C, Sriwanichrak K. False-positive serum and bronchoalveolar lavage *Aspergillus* galactomannan assays caused by different antibiotics. *Scand J Infect Dis* 2010; 42(6-7):461-8.
28. Aubry A, Porcher R, Bottero J, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2):389-94.
29. Khot PD, Ko DL, Hackman RC, Fredricks DN. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infect Dis* 2008; 8:73.
30. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(2): 89-96.
31. Reinwald M, Spiess B, Heinz WJ, et al. Diagnosing pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies: a multicenter prospective evaluation of an *Aspergillus* PCR assay and a galactomannan ELISA in bronchoalveolar lavage samples. *Eur J Haematol* 2012; 89(2): 120-7.
32. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *J Clin Microbiol* 2012; 50(11): 3652-8.